

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-304697

(43)Date of publication of application : 02.11.2000

(51)Int.Cl.

G01N 21/64

(21)Application number : 11-111157

(71)Applicant : BUNSHI BIOPHOTONICS  
KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 19.04.1999

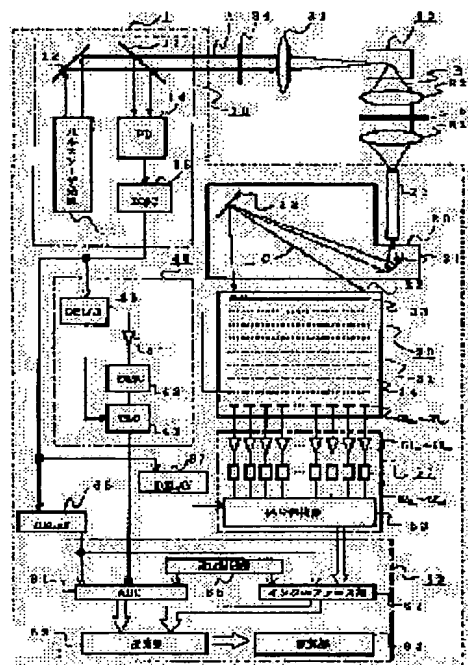
(72)Inventor : OSUGA SHINJI  
OSUGI AKIRA

## (54) METHOD AND APPARATUS FOR MEASUREMENT OF FLUORESCENCE LIFE

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method and an apparatus for the measurement of a fluorescence life in which the fluorescence life or a fluorescence attenuation curve of a plurality of components of fluorescence can be measured with a good efficiency and simply.

**SOLUTION:** Fluorescence B which is generated from a sample 90 accompanying the irradiation with pulse excitation light A outputted from an excitation light source 10 is decomposed into a plurality of components by a spectroscope 20 so as to be incident on a photodetector 30. Current pulse signals are outputted from anode electrodes 3501 to 3532 of the photodetector corresponding to the respective components out of the anode electrodes. The fluorescence photon detecting time which is measured by a fluorescence-photon detecting time measuring part 40 is estimated on the basis of the current pulse signals, a fluorescence life or a fluorescence attenuation curve regarding the plurality of components is estimated on the basis of the number of detected fluorescence photons measured by a number of fluorescent photons measuring part 50 and on the basis of whether fluorescent photons regarding the plurality of components are detected or not.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

1/3

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-304697

(P 2 0 0 0 - 3 0 4 6 9 7 A)

(43) 公開日 平成12年11月2日 (2000. 11. 2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

識別記号

F I

テロート\* (参考)

G 0 1 N 21/64

G 0 1 N 21/64

B 2G043

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平11-111157  
(22) 出願日 平成11年4月19日 (1999. 4. 19)

(71) 出願人 595047385  
株式会社分子バイオホトニクス研究所  
静岡県浜北市平口5000番地  
(72) 発明者 大須賀 慎二  
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
バイオホトニクス研究所内  
(72) 発明者 大杉 晃  
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
バイオホトニクス研究所内  
(74) 代理人 100088155  
弁理士 長谷川 芳樹 (外2名)

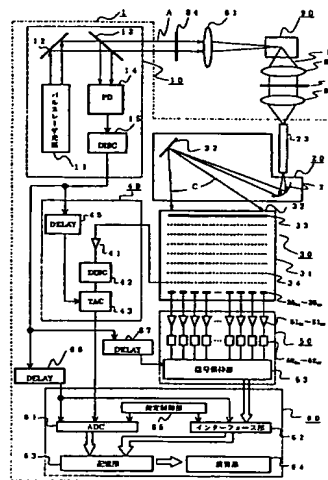
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光寿命測定方法および装置

(57) 【要約】

【課題】 蛍光の複数の成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を効率よく且つ簡易に測定することができる蛍光寿命測定方法および装置を提供する。

【解決手段】 励起光源部10から出力されたパルス励起光Aの照射に伴い試料90で発生した蛍光Bは、分光器20により複数の成分に分解されて光検出器30に入射する。光検出器30のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>のうち各成分に対応したアノード電極から電流パルス信号が出力される。この電流パルス信号に基づいて蛍光光子検出時間測定部40により測定された蛍光光子検出時間、ならびに、蛍光光子数測定部50により測定された蛍光光子の検出個数および複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無に基づいて、複数の成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線が推定される。



FP04-0135  
-00W0-HP  
'04.10.-5  
SEARCH REPORT

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 パルス励起光が試料に照射されて発生した蛍光の蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する蛍光寿命測定方法であって、

前記パルス励起光を前記試料に繰り返し照射して、前記パルス励起光の各パルス毎に、前記蛍光を複数の成分に分解し、前記パルス励起光が前記試料に照射された時刻から最初の蛍光光子が検出された時刻までの蛍光光子検出時間を測定するとともに、蛍光光子の検出個数および前記複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無を測定し、

前記パルス励起光の各パルス毎に測定された前記蛍光光子検出時間、前記蛍光光子の検出個数および前記複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無に基づいて、前記複数の成分それぞれの前記蛍光寿命または前記蛍光減衰曲線を推定する、

ことを特徴とする蛍光寿命測定方法。

【請求項2】 前記蛍光を複数の波長成分に分解して、前記複数の波長成分それぞれの前記蛍光寿命または前記蛍光減衰曲線を推定する、ことを特徴とする請求項1記載の蛍光寿命測定方法。

【請求項3】 パルス励起光が試料に照射されて発生した蛍光の蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する蛍光寿命測定装置であって、

前記パルス励起光を出力し前記試料に照射する励起光源部と、

前記試料で発生した蛍光を複数の成分に分解する分解光学系と、

前記分解光学系により分解された蛍光を入力し前記蛍光の光量に応じた個数の光電子を放出する光電変換面と、前記光電変換面から放出された光電子を増倍して二次電子を発生させる電子増倍部と、前記複数の成分それぞれについて2以上設けられ前記二次電子の入力に応じて電流パルス信号をそれぞれ出力する所定数のアノード電極と、前記蛍光を透過させる入射窓を有し前記光電変換面、前記電子増倍部および前記所定数のアノード電極を内部に含む真空容器と、を有する光検出器と、

前記パルス励起光が前記試料に照射された時刻から最初の蛍光光子が前記光検出器により検出された時刻までの蛍光光子検出時間を前記パルス励起光の各パルス毎に測定する蛍光光子検出時間測定部と、

前記所定数のアノード電極のうち少なくとも1個の蛍光光子に対応する電流パルス信号を出力したアノード電極の位置および個数に基づいて、前記光検出器により検出された蛍光光子の検出個数および前記複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無を前記パルス励起光の各パルス毎に測定する蛍光光子数測定部と、

前記試料に繰り返し照射された前記パルス励起光の各パルス毎に前記蛍光光子検出時間測定部により測定された蛍光光子検出時間ならびに前記蛍光光子数測定部により

測定された蛍光光子の検出個数および前記複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無に基づいて、前記複数の成分それぞれの前記蛍光寿命または前記蛍光減衰曲線を推定する蛍光寿命推定部と、

を備えることを特徴とする蛍光寿命測定装置。

【請求項4】 前記分解光学系は、前記蛍光を複数の波長成分に分解し、

前記蛍光寿命推定部は、前記複数の波長成分それぞれの前記蛍光寿命または前記蛍光減衰曲線を推定する、ことを特徴とする請求項3記載の蛍光寿命測定装置。

【請求項5】 前記分解光学系は、前記蛍光を複数の波長成分に分光してその分光した各波長成分を前記所定数のアノード電極の何れかに対応する前記光電変換面の領域に入射させる分光器を含む、ことを特徴とする請求項4記載の蛍光寿命測定装置。

【請求項6】 前記分解光学系は、前記蛍光の複数の波長成分それぞれを互いに異なる領域で透過させてその透過させた各波長成分を前記所定数のアノード電極の何れかに対応する前記光電変換面の領域に入射させる光学フィルタを含む、ことを特徴とする請求項4記載の蛍光寿命測定装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、励起光が照射された蛍光物質から発生する蛍光の蛍光寿命または蛍光減衰曲線を測定する蛍光寿命測定方法および装置に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、試料に含まれる蛍光物質から発生する蛍光の蛍光寿命の測定方法として時間相関単一光子計数法による方法が知られている。この時間相関単一光子計数法による測定では、パルス励起光の1パルス照射当たりを検出される蛍光の平均光子数が1より十分に小さい値（例えば、0.01）となるような強度の弱いパルス励起光を試料に照射し、パルス励起光が試料に照射された時刻から最初に蛍光光子を検出した時刻までの蛍光光子検出時間を測定する。そして、試料にパルス励起光を繰り返し照射して蛍光光子検出時間についてのヒストグラムを生成し、そのヒストグラムに基づいて蛍光の蛍光寿命を測定するものである。なお、蛍光光子の検出には光電子増倍管が通常用いられている。

【0003】また、蛍光物質から発生する蛍光が複数の成分（例えば複数の波長帯）を有する場合に、従来の時間相関単一光子計数法により蛍光の複数の成分それぞれの蛍光寿命を測定するためには、測定しようとする成分の数だけ測定を繰り返すか、或いは、成分の数と同数の蛍光光子検出時間測定部を用意することが必要となる。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、時間相関単一光子計数法による測定では、その原理上、パルス

励起光の 1 パルス照射当たりを検出される蛍光光子の個数を非常に小さくし、パルス励起光の照射パルス数に対して蛍光光子検出頻度を数%以下にする必要がある。その結果、蛍光寿命の測定精度は悪く、十分な精度で蛍光寿命を求めるには長時間の測定を必要とするという問題点がある。

【0005】また、蛍光の複数の成分（例えば複数の波長帯）それぞれの蛍光寿命を測定するために成分の数だけ測定を繰り返すとすれば、測定の手間が煩瑣になり、測定に長時間を要するという問題点がある。また、成分の数と同数の蛍光光子検出時間測定部を用意するとすれば、装置が複雑になるという問題点がある。

【0006】本発明は、上記問題点を解消する為になされたものであり、蛍光の複数の成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を効率よく且つ簡易に測定することができる蛍光寿命測定方法および装置を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明に係る蛍光寿命測定方法は、パルス励起光が試料に照射されて発生した蛍光の蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する蛍光寿命測定方法であって、(1)パルス励起光を試料に繰り返し照射して、パルス励起光の各パルス毎に、蛍光を複数の成分に分解し、パルス励起光が試料に照射された時刻から最初の蛍光光子が検出された時刻までの蛍光光子検出時間を測定するとともに、蛍光光子の検出個数および複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無を測定し、(2)パルス励起光の各パルス毎に測定された蛍光光子検出時間、蛍光光子の検出個数および複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無に基づいて、複数の成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する、ことを特徴とする。また、本発明に係る蛍光寿命測定方法では、蛍光を複数の波長成分に分解して、複数の波長成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定することを特徴とする。

【0008】本発明に係る蛍光寿命測定装置は、パルス励起光が試料に照射されて発生した蛍光の蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する蛍光寿命測定装置であって、(1)パルス励起光を出力し試料に照射する励起光源部と、(2)試料で発生した蛍光を複数の成分に分解する分解光学系と、(3)分解光学系により分解された蛍光を入力し蛍光の光量に応じた個数の光電子を放出する光電変換面と、光電変換面から放出された光電子を増倍して二次電子を発生させる電子増倍部と、複数の成分それぞれについて 2 以上設けられ二次電子の入力に応じて電流パルス信号をそれぞれ出力する所定数のアノード電極と、蛍光を透過させる入射窓を有し光電変換面、電子増倍部および所定数のアノード電極を内部に含む真空容器と、を有する光検出器と、(4)パルス励起光が試料に照射された時刻から最初の蛍光光子が光検出器により検出され

た時刻までの蛍光光子検出時間をパルス励起光の各パルス毎に測定する蛍光光子検出時間測定部と、(5)所定数のアノード電極のうち少なくとも 1 個の蛍光光子に対応する電流パルス信号を出力したアノード電極の位置および個数に基づいて、光検出器により検出された蛍光光子の検出個数および複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無をパルス励起光の各パルス毎に測定する蛍光光子数測定部と、(6)試料に繰り返し照射されたパルス励起光の各パルス毎に蛍光光子検出時間測定部により測定された蛍光光子検出時間ならびに蛍光光子数測定部により測定された蛍光光子の検出個数および複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無に基づいて、複数の成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する蛍光寿命推定部と、を備えることを特徴とする。

【0009】この蛍光寿命測定装置によれば、励起光源部から出力されたパルス励起光は試料に照射され、その照射に伴い試料で発生した蛍光は分解光学系により複数の成分に分解されて光検出器の光電変換面に入射する。光検出器の所定数のアノード電極のうち各成分に対応したアノード電極から電流パルス信号が出力される。蛍光光子検出時間測定部により、パルス励起光が試料に照射された時刻から最初の蛍光光子が光検出器により検出された時刻までの蛍光光子検出時間がパルス励起光の各パルス毎に測定される。また、蛍光光子数測定部により、光検出器の所定数のアノード電極のうち少なくとも 1 個の蛍光光子に対応する電流パルス信号を出力したアノード電極の位置および個数に基づいて、光検出器により検出された蛍光光子の検出個数、および、複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無が、パルス励起光の各パルス毎に測定される。そして、蛍光寿命推定部により、試料に繰り返し照射されたパルス励起光の各パルス毎に得られた蛍光光子検出時間、蛍光光子の検出個数および複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無に基づいて、複数の成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線が推定される。

【0010】また、本発明に係る蛍光寿命測定装置では、分解光学系は、蛍光を複数の波長成分に分解し、蛍光寿命推定部は、複数の波長成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する、ことを特徴とする。分解光学系は、蛍光を複数の波長成分に分光してその分光した各波長成分を所定数のアノード電極の何れかに対応する光電変換面の領域に入射させる分光器を含むのが好適であり、また、蛍光の複数の波長成分それぞれを互いに異なる領域で透過させてその透過させた各波長成分を所定数のアノード電極の何れかに対応する光電変換面の領域に入射させる光学フィルタを含むのも好適である。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、添付図面を参照して本発明の実施の形態を詳細に説明する。なお、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を

省略する。

【0012】図1は本実施形態に係る蛍光寿命測定装置の構成図である。この蛍光寿命測定装置1は、パルス励起光Aを出力して試料90に照射する励起光源部10と、試料90から発生した蛍光Bを波長別に分光する分光器（分解光学系）20と、波長別に分光された蛍光Cを検出して複数のアノード電極から電流パルス信号を出力する光検出器30と、パルス励起光Aが試料90に照射された時刻から最初の蛍光光子が光検出器30により検出された時刻までの蛍光光子検出時間をパルス励起光Aの各パルス毎に測定する蛍光光子検出時間測定部40と、光検出器30の複数のアノードから出力される電流パルス信号に基づいて光検出器30により検出された蛍光光子の検出個数および各波長成分別の蛍光光子の検出の有無をパルス励起光Aの各パルス毎に測定する蛍光光子数測定部50と、蛍光光子検出時間測定部40により測定された蛍光光子検出時間ならびに蛍光光子数測定部50により測定された蛍光光子の検出個数および各波長成分別の蛍光光子の検出の有無に基づいて蛍光の各波長成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する蛍光寿命推定部60と、を備えて構成される。

【0013】励起光源部10は、パルスレーザ光源11、フォトダイオード14および波高弁別器15等を備えている。パルスレーザ光源11は、パルス励起光を繰り返し出力する。反射鏡12は、パルスレーザ光源11から出力されたパルス励起光を反射する。ビームスプリッタ13は、反射鏡12により反射されたパルス励起光の一部を反射させ、残部を透過させる。フォトダイオード14は、ビームスプリッタ13により反射されたパルス励起光の部分を受光して、その光量に応じた電流信号を出力する。波高弁別器15は、フォトダイオード14から出力された電流信号を受けて、パルス励起光が出力された時刻を示すタイミング信号を出力する。

【0014】この励起光源部10のビームスプリッタ13を透過したパルス励起光Aは、バンドパスフィルタ84を透過したのちレンズ81により集光され、試料90に照射される。そして、このパルス励起光Aの照射に伴い試料90に含まれる蛍光物質から発生した蛍光Bは、レンズ82により平行光にされ、バンドパスフィルタ85を透過して励起光の散乱光等が除去された後、レンズ83により集光され、光ファイバ23の一端に入射する。

【0015】分光器20は、反射集光鏡21および分散素子22を備えている。反射集光鏡21は、光ファイバ23の他端から出射し分光器20に入射した蛍光Bを反射させ、分散素子22の位置に集光させる。分散素子22は、反射集光鏡21により反射集光された蛍光Bを分光し、その分光された蛍光Cを光検出器30の入射窓32に入射させる。

【0016】光検出器30は、分光された蛍光Cを透過

させる入射窓32を有する真空容器31内に、入射した光の光量に応じた個数の光電子を放出する光電変換面33、その光電子を順次増倍して多数の二次電子を発生させる複数段（この図では7段）のダイノード34からなる電子増倍部、および、その二次電子を受けて電流パルス信号を出力する複数個（ここでは8行×4列で計32個）のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>を備えるものである。電子増倍部は、多段の格子状ダイノードであってもよいし、マイクロチャンネルプレートであってもよい。

10 【0017】図1では表示を容易にするために、32個のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>を1列に展開して表示している。アノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>は、光電変換面33と平行な面内に2次元配列されており、各列の8個のアノード電極は、蛍光の同じ波長範囲の光電子を受けように配置される。別の列のアノード電極は、別の波長範囲の光電子を受ける。ここでは、列数すなわち蛍光の波長範囲の数を4としている。

【0018】この光検出器30において、光電変換面33がアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>に対して低電位とされ、また、ダイノード34の各段にも所定の電圧が印加されているときに、分光された蛍光Cが入射窓32を透過して光電変換面33に入射すると、その光量に応じた個数の光電子が光電変換面33から放出される。この光電子が電子増倍部のダイノード34の各段により増倍されて、多数の二次電子が発生し、その二次電子は32個のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>のうちの何れかに到達する。

【0019】このとき、電子増倍部における光電子の二次電子増倍は、光電変換面33上における蛍光光子入射すなわち光電子放出の位置関係を保持したまま行われる。したがって、二次電子が到達して電流パルス信号を出力するアノード電極は、分光された蛍光Cが光電変換面33に入射した位置に対応したものである。すなわち、各列の8個のアノード電極が出力する電流パルスは、同じ波長範囲の蛍光に対応したものである。

【0020】蛍光光子検出時間測定部40は、増幅器41、波高弁別器42、時間振幅変換器43および信号遅延器45を備えている。増幅器41は、光検出器30の最終段のダイノード34から出力される電流パルス信号を入力し、この電流パルス信号を電圧パルス信号に変換し、この電圧パルス信号を増幅して出力する。なお、ここで、ダイノード34から出力される電流パルス信号を1個の増幅器41が増幅するのは、ダイノード34が32個のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>に対して共通だからである。

【0021】波高弁別器42は、増幅器41から出力される電圧パルス信号を入力して、その電圧パルス信号の波高値が所定の閾値電圧より高い場合にタイミング信号を出力する。すなわち、この波高弁別器42から出力されるタイミング信号は、分光された蛍光Cが光検出器3

0により検出されたタイミングを示すものである。信号遅延器45は、波高弁別器15から出力されたタイミング信号を入力し、このタイミング信号を所定の時間だけ遅らせて出力する。

【0022】時間振幅変換器43は、波高弁別器42から出力されたタイミング信号および信号遅延器45から出力されたタイミング信号に基づいて、これら2つのタイミング信号の時間差に応じた電圧信号を出力する。この時間振幅変換器43から出力される電圧信号は、パルス励起光Aが試料90に入射した時刻から波長別に分光された蛍光Cの最初の光子が光検出器30により検出された時刻までの蛍光光子検出時間に応じたものである。

【0023】蛍光光子数測定部50は、光検出器30のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>02</sub>と等しい数すなわち32個の増幅器51<sub>01</sub>～51<sub>02</sub>、同じく32個の波高弁別器52<sub>01</sub>～52<sub>02</sub>、および、32個の波高弁別器52<sub>01</sub>～52<sub>02</sub>それぞれから出力される信号を処理する信号保持器53を備えている。アノード電極35<sub>j</sub>と増幅器51<sub>j</sub>とは一対一で対応し、また、増幅器51<sub>j</sub>と波高弁別器52<sub>j</sub>とも一対一で対応している(j=01～32)。

【0024】増幅器51<sub>j</sub>は、アノード電極35<sub>j</sub>から出力された電流パルス信号を電圧パルス信号に変換し、その電圧パルス信号を増幅して出力する(j=01～32)。波高弁別器52<sub>j</sub>は、増幅器51<sub>j</sub>から出力された電圧パルス信号を受けて、その電圧パルス信号の波高値が所定の閾値電圧よりも高い場合に論理パルス信号を出力する(j=01～32)。すなわち、波高弁別器52<sub>j</sub>は、測定しようとする分光された蛍光Cの少なくとも1個の蛍光光子に対応した波高値を有する電流パルス信号がアノード電極35<sub>j</sub>から出力された場合にのみ論理パルス信号を出力する(j=01～32)。したがって、32個の波高弁別器52<sub>01</sub>～52<sub>02</sub>のうち論理パルス信号を出力したものの数は、光検出器30により検出された蛍光Cの光子数に応じたものである。また、同じ波長範囲の蛍光を受けるように置かれた一列のアノード電極に対応する波高弁別器のうち論理パルス信号を出力したものの数は、その波長範囲の蛍光光子の検出個数に応じたものである。

【0025】信号保持器53は、32個の波高弁別器52<sub>01</sub>～52<sub>02</sub>それぞれから出力された論理パルス信号を、信号遅延器67からのタイミング信号により指示されるタイミングで読み込み、その論理状態(32ビットデジタル値)を所定の時間保持して出力し続ける。この信号保持器53により保持され出力される論理状態は、光検出器30により検出された蛍光光子の検出個数、および、複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無を表す。なお、信号遅延器67は、波高弁別器15から出力されたタイミング信号を入力し、このタイミング信号を一定時間だけ遅延させて出力するものである。

【0026】蛍光寿命推定部60は、AD変換器61、

インターフェース部62、記憶部63、演算部64および測定制御部65を備えている。AD変換器61は、蛍光光子検出時間測定部40の時間振幅変換器43から出力された電圧信号を受けて、その電圧値に応じたデジタル信号にAD変換し、このデジタル信号を出力する。このAD変換器61が出力するデジタル信号は、蛍光光子検出時間を表わすものである。インターフェース部62は、蛍光光子数測定部50の信号保持器53から出力される信号の状態を読み込む。AD変換器61におけるAD変換およびインターフェース部62における信号の読み込みは、信号遅延器66から出力されたタイミング信号により制御される。なお、信号遅延器66は、波高弁別器15から出力されたタイミング信号を入力し、このタイミング信号を一定時間だけ遅延させて出力するものである。

【0027】測定制御部65は、AD変換器61およびインターフェース部62それぞれに対して所定回数のデータの取り込みを指示し、パルス励起光Aの各パルス毎に、AD変換器61からのデジタル値(蛍光光子検出時間に相当しAD変換器の分解能が12ビットであれば2バイト(16ビット)のデジタル値)と、インターフェース部62からのデジタル値(検出された蛍光光子の検出個数と波長成分別の蛍光光子の検出の有無に関する情報とを含む32ビットのデジタル値)とを、組にして記憶部63に保存する。演算部64は、記憶部63に保存されたデータに基づいて、各波長成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する。

【0028】次に、本実施形態に係る蛍光寿命測定装置1の作用とともに蛍光寿命推定部60の演算部64における処理内容について説明し、併せて、本発明に係る蛍光寿命測定方法の一実施形態について説明する。

【0029】励起光源部10内のパルスレーザ光源11から繰り返し出力されたパルス励起光Aは、反射鏡12、ビームスプリッタ13、バンドパスフィルタ84およびレンズ81を順次を経て試料90に照射される。このパルス励起光Aの照射に伴い試料90内の蛍光物質から発生した蛍光Bは、レンズ82、バンドパスフィルタ85、レンズ83および光ファイバ23を順次を経て分光器20に入射する。分光器20に入射した蛍光Bは、反射集光鏡21および分散素子22により分光され、この分光された蛍光Cが分光器20より出射する。

【0030】光検出器30では、分光された蛍光Cが入射窓32を透過して光電変換面33に入射すると、その光量に応じた個数の光電子が光電変換面33から放出され、複数段のダイノード34からなる電子増倍部により二次電子が増倍される。そして、その二次電子が複数のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>02</sub>のうちの何れかに入射し、二次電子が入射したアノード電極から電流パルス信号が出力される。アノード電極35<sub>j</sub>から出力された電流パルス信号は、当該アノード電極に対応する蛍光光子数測

定部50内の増幅器51により、電圧パルス信号に変換され、その電圧パルス信号が増幅され出力される( $j=01\sim32$ )。

【0031】増幅器51から出力された電圧パルス信号は、対応する波高弁別器52により弁別され、その電圧パルス信号の波高値が所定の閾値電圧よりも高い場合に論理パルス信号が出力される( $j=01\sim32$ )。これらの波高弁別器52<sub>01</sub>～52<sub>32</sub>それぞれが出力した論理パルス信号は、信号遅延器67からのタイミング信号により指示されるタイミングで信号保持器53により読み込まれ、信号保持器53により所定の時間保持され出力され続ける。このとき、光検出器30内に設けられているアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>の個数32と比較して、パルス励起光Aの1パルス照射当たりにおける論理パルス信号を出力する波高弁別器の個数が充分少なければ、論理パルス信号を出力した波高弁別器の個数は、光検出器30により検出された蛍光光子の個数に等しいものと考えてよい。

【0032】一方、パルスレーザ光源11から出力されたパルス励起光の一部はビームスプリッタ13により反射されてフォトダイオード14に入射して、フォトダイオード14から電流信号が出力される。そして、フォトダイオード14から出力された電流信号を受けた波高弁別器15から、パルス励起光が出力された時刻を示すタイミング信号が出力される。このタイミング信号は、信号遅延器45により所定時間だけ遅延される。また、光検出器30の最終段のダイノード34から出力される電流パルス信号に基づいて、光検出器30により蛍光Cの蛍光光子が最初に検出されたタイミングを示すタイミング信号が、蛍光光子検出時間測定部40の増幅器41および波高弁別器42により生成される。そして、時間振幅変換器43により、波高弁別器42から出力されたタイミング信号および波高弁別器15から出力され信号遅延器45で遅延されたタイミング信号に基づいて、パルス励起光Aが試料90に入射した時刻から蛍光Cの最初の光子が光検出器30により検出された時刻までの蛍光光子検出時間に応じた電圧信号が出力される。

【0033】そして、パルスレーザ光源11から繰り返し出力されたパルス励起光Aの各パルス毎に、波高弁別器15から出力され信号遅延器66で遅延されたタイミング信号により指示されるタイミングで、蛍光光子検出時間測定部40の時間振幅変換器43から出力された電圧信号はAD変換器61を介して蛍光寿命推定部60に入力され、蛍光光子数測定部50の信号保持器53の出力の状態はインターフェース部62を介して蛍光寿命推定部60に入力される。

【0034】図2は、本実施形態に係る蛍光寿命測定装置の記憶部および演算部を説明する図である。記憶部63には、図2に示すように、時間振幅変換器43から出力された電圧信号がAD変換器61によりAD変換され

て出力された16ビットデジタル値、および、信号保持器53の出力の状態を示す32ビットデジタル値が、パルス励起光Aの多数(以下ではNとする)のパルス毎に組にして記憶される。

【0035】演算部64において、インターフェース部62により読み込まれ記憶部63に保存された32ビットデジタル値に基づいて、光検出器30により検出された蛍光Cの光子の検出個数、および、各波長成分別に蛍光光子が検出されたか否かを示すベクトル(以下では「ヒットベクトル」という)が求められる。また、演算部64において、時間振幅変換器43からの電圧信号がAD変換器61によりAD変換されて記憶部63に保存された16ビットデジタル値に基づいて、パルス励起光Aが試料90に入射した時刻から分光された蛍光Cの最初の光子が光検出器30により検出された時刻までの蛍光光子検出時間が求められる。

【0036】演算部64には、図2に示すように、パルス励起光AのNパルスそれぞれについて、ヒットベクトル $W_i$ 、蛍光光子検出個数 $n_i$ および蛍光光子検出時間 $T_i$ が1組として記憶される( $i=1\sim N$ )。そして、演算部64では、N組のヒットベクトル $W_i$ 、蛍光光子検出個数 $n_i$ および蛍光光子検出時間 $T_i$ ( $i=1\sim N$ )に基づいて、分光された蛍光Cの各波長成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線が以下のようにして推定される。なお、以下では、試料90の蛍光物質から発生し分光された蛍光Cの各波長成分それぞれの蛍光減衰曲線が単一指数関数で表される場合について説明する。

【0037】各波長成分(ここでは4成分)それぞれの蛍光寿命を $1/\Gamma_1$ 、 $1/\Gamma_2$ 、 $1/\Gamma_3$ および $1/\Gamma_4$ とする。これらパラメータ $\Gamma_1$ 、 $\Gamma_2$ 、 $\Gamma_3$ および $\Gamma_4$ それぞれは、その値が推定されるべきものである。また、パルス励起光Aが試料90に入射した時刻を基準( $t=0$ )として、時刻 $t$ から時刻 $t+dt$ までの微小時間 $dt$ の間に光検出器30により波長成分 $k$ ( $k=1\sim4$ )の蛍光光子が検出される確率 $p_k(t)dt$ は、

【0038】

【数1】

$$p_k(t)dt = \Gamma_k \exp(-\Gamma_k t) dt \quad \dots(1)$$

【0039】なる式で与えられるものとする。演算部64では、パラメータ $\Gamma_1$ 、 $\Gamma_2$ 、 $\Gamma_3$ および $\Gamma_4$ それぞれの値の推定に先立ち、パルス励起光Aの1パルス照射当たり光検出器30の光電変換面33から放出される各波長成分それぞれの平均光電子数が以下の様に推定される。

【0040】記憶部63に記憶されている32ビットのデジタル値から32個のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>それぞれのヒット総数を求める。すなわち、N回のパルス励起光照射のうちの第 $i$ 番目のパルス励起光照射により得られた32ビットデジタル値を2進数表記で( $b_{32}b$



$a_1 \cdots b_2 b_1$ で表せば、アノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>のうちの第j番目のアノード電極35<sub>j</sub>のヒット総数 $m_j$ は、

【0041】  
【数2】

$$m_j = \sum_{i=1}^N (b_i)_j \quad \dots(2)$$

$$\begin{aligned} \mu_1 &= \sum_{j=1}^4 \left\{ -\log \left( 1 - \frac{m_j}{N} \right) \right\}, \quad \mu_2 = \sum_{j=5}^8 \left\{ -\log \left( 1 - \frac{m_j}{N} \right) \right\} \\ \mu_3 &= \sum_{j=9}^{12} \left\{ -\log \left( 1 - \frac{m_j}{N} \right) \right\}, \quad \mu_4 = \sum_{j=13}^{16} \left\{ -\log \left( 1 - \frac{m_j}{N} \right) \right\} \end{aligned} \quad \dots(3)$$

【0045】なる式で推定される。ただし、アノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>08</sub>は第1の波長成分に対応し、アノード電極35<sub>09</sub>～35<sub>16</sub>は第2の波長成分に対応し、アノード電極35<sub>17</sub>～35<sub>24</sub>は第3の波長成分に対応し、また、アノード電極35<sub>25</sub>～35<sub>32</sub>は第4の波長成分に対応している。

【0046】そして、推定された平均光電子数 $\mu_1, \mu_2, \mu_3$ および $\mu_4$ 、ならびに、N組の蛍光光子検出時間 $T_i$ 、ヒットベクトル $W_i$ および蛍光光子検出個数 $n_i$  ( $i=1 \sim N$ )に基づいて、パラメータ $\Gamma_1, \Gamma_2, \Gamma_3$ および $\Gamma_4$ それぞれの値を推定する。ヒットベクトル $W$ は、アノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>の列の数（ここでは4個）すなわち分光された波長成分の数と同数の要素をもつベクトル( $w_1, w_2, w_3, w_4$ )とする。ヒットベクトル $W$ の各要素 $w_k$  ( $k=1 \sim 4$ )は、第k番目の波長成分に対応するアノード電極の列において出力が少なくとも一つあれば値1とし、一つも無ければ値0とする。

【0047】図3は、本実施形態に係る蛍光寿命測定装置の光検出器のアノード電極における蛍光光子検出の一例とヒットベクトル $W$ および蛍光光子検出個数 $n$ との関係を示す図である。この図における4×8個のマスキ

$$p(T|W, n) = \frac{n! \int_0^{T+\Delta T} p(t|W) dt \left\{ \int_0^T p(t|W) dt \right\}^{n-1}}{\left\{ \int_0^{T+\Delta T} p(t|W) dt \right\}^n} \quad \dots(5)$$

【0052】で与えられる。

【0053】また、 $p(T|W)$ は、ヒットベクトル $W = (w_1, w_2, w_3, w_4)$ が与えられたときに時刻 $t$ に

$$p(t|W) = \frac{1}{\sum_{i=1}^4 w_i \mu_i} \sum_{i=1}^4 w_i \mu_i \Gamma_i \exp(-\Gamma_i t) \quad \dots(6)$$

$$W = (w_1, w_2, w_3, w_4) = 0 = (0, 0, \dots, 0)$$

【0055】なる式で与えられるものとする。 $T$ は、蛍光光子が蛍光光子数測定部50により計数さ

【0042】で与えられる ( $i=1 \sim N, j=1 \sim 32$ )。

【0043】そしてパルス励起光Aの1パルス照射当りに検出される各波長成分それぞれの平均光電子数 $\mu_1, \mu_2, \mu_3$ および $\mu_4$ それぞれは、

【0044】  
【数3】

は、32個のアノード電極35<sub>01</sub>～35<sub>32</sub>を表している。4つの列（各列は8個のアノード電極を含む）それぞれは、蛍光Cの波長成分 $\lambda_1 \sim \lambda_4$ に対応している。また、黒く塗りつぶされたマスキは、蛍光光子を検出して電流パルス信号を出力したアノード電極を表している。

20 この図に示す場合には、ヒットベクトル $W$ は(0, 1, 0, 1)であり、蛍光光子検出個数 $n$ は3である。

【0048】演算部64では、N組の蛍光光子検出時間 $T_i$ 、ヒットベクトル $W_i$ および蛍光光子検出個数 $n_i$  ( $i=1 \sim N$ )に基づいて、

【0049】  
【数4】

$$\log L = \sum_{i=1}^N \log \{ p(T_i | W_i, n_i) \} \quad \dots(4)$$

30 【0050】なる式で表わされる対数尤度が計算される。ここで、 $p(T|W, n)$ は、ヒットベクトル $W$ および蛍光光子検出個数 $n$ が与えられたときに蛍光光子検出時間が $T$ である条件付き確率密度関数であり、

【0051】  
【数5】

蛍光光子が検出される条件付き確率密度関数であり、

【0054】  
【数6】

50 れ得る最大の時間であり、パルス励起光Aの各パルス毎に発生する蛍光の殆どの光子が光検出器30により検出

される時間に設定される。パルス励起光Aが試料90に照射されてからT<sub>0</sub>までの間に検出された蛍光光子の数が蛍光光子検出個数となる。ΔTは、AD変換器61から出力されるデジタル信号のビン幅に対応する実際の時間幅である。

【0056】そして、演算部64では、上記(4)式で表わされる対数尤度を最大化するパラメータΓ<sub>k</sub> (k=1~4)の値が計算され、各波長成分それぞれの蛍光寿命1/Γ<sub>k</sub>の値が推定される。なお、対数尤度の最大化による推定に際しては、準ニュートン法等の一般的な最適化アルゴリズムが好適に用いられる。

【0057】次に、蛍光寿命の推定に関するシミュレーション結果について説明する。以下では、4列のアノード電極それぞれに対応する波長成分をλ<sub>1</sub>, λ<sub>2</sub>, λ<sub>3</sub>およびλ<sub>4</sub>とし、2つの蛍光成分を仮定した。図4は、シミュレーションで仮定した蛍光の波長分布を示す図である。第1の蛍光成分は、蛍光の波長範囲をλ<sub>1</sub>およびλ<sub>2</sub>として、各々の波長で、1励起あたりの平均光電子数を0.15とし、蛍光寿命を1/(2.0×10<sup>-3</sup>)とした。また、第2の蛍光成分は、蛍光の波長範囲をλ<sub>2</sub>, λ<sub>3</sub>およびλ<sub>4</sub>として、各々の波長で、1励起あたりの平均光電子数を0.10とし、蛍光寿命を1/(4.0×10<sup>-3</sup>)とした。

【0058】シミュレーションで使用した時間単位は、時間振幅変換器43のフルスケールとAD変換器61の分解能とで決まる値とした。すなわち、AD変換器61が12ビットデジタル値を出力するものとして、時間単位は、時間振幅変換器43のフルスケールをAD変換器61の分解能4096で除算したものとした、ここで仮定した1励起あたりの平均光電子数の合計は0.6であり、この値は従来の時間相関単一光子計数法が適用される平均光電子数よりも1桁以上大きい。また、シミュレーションでは、励起回数Nを160万回として1データセットを生成し、60個のデータセットを生成した。そして、各データセットに基づいてパラメータΓ<sub>k</sub> (k=1~4)を推定し、60個のデータセットそれぞれで得られたパラメータΓ<sub>k</sub> (k=1~4)の推定値の平均値を算出した。

【0059】図5は、シミュレーションに使用したパラメータと推定結果とを示す図表である。波長λ<sub>1</sub>, λ<sub>3</sub>およびλ<sub>4</sub>それぞれにおいては、偏差2%未満の精度でシミュレーションに使用したパラメータの値と推定値の平均値とが一致した。二つの蛍光成分が混じった波長λ<sub>2</sub>においても、二つの蛍光成分の蛍光寿命の平均的な値が得られた。

【0060】本発明は、上記実施形態に限定されるものではなく、種々の変形が可能である。例えば、上記実施形態に係る蛍光寿命測定装置では、蛍光を分光するのに分光器を使用したのが、バンドパスフィルタなどの光学フィルタであってもよい。この場合、光学フィルタは、光

検出器30の入射窓32の前面に配置され、試料から到達した蛍光の複数の波長成分それぞれを互いに異なる領域で透過させて、その透過させた各波長成分を、アノード電極35<sub>01</sub>~35<sub>02</sub>の何れかに対応する光電変換面33の領域に入射させる。

【0061】また、上記実施形態では蛍光を波長によって4つに分けたが、波長ではなく空間的な位置によって複数の成分に分解してもよい。また、上記実施形態ではアノード電極の配列を4列で各列8個としたが、8列で各列4個、すなわち8個の成分に分解してもよいし、8列で各列8個であってもよい。

【0062】

【発明の効果】以上、詳細に説明したとおり、本発明によれば、パルス励起光を試料に繰り返し照射して、パルス励起光の各パルス毎に、蛍光を複数の成分(波長成分)に分解し、パルス励起光が試料に照射された時刻から最初の蛍光光子が検出された時刻までの蛍光光子検出時間を測定するとともに、蛍光光子の検出個数および複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無を測定する。そして、パルス励起光の各パルス毎に測定された蛍光光子検出時間、蛍光光子の検出個数および複数の成分それぞれの蛍光光子検出の有無に基づいて、複数の成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定する。

【0063】このようにして複数の成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定することにより、パルス励起光の1パルス照射当たりに検出される蛍光光子の個数が多くても正確に蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定することができる。また、従来の時間相関単一光子計数法による測定の場合と比較して蛍光光子検出頻度を1桁以上大きくすることができるので、蛍光寿命または蛍光減衰曲線を短時間に効率よく測定することができる。さらに、蛍光光子検出時間測定部が1個であるにも拘わらず、蛍光を複数の成分に分解して各蛍光成分それぞれの蛍光寿命または蛍光減衰曲線を推定できるので、装置を複雑にしないで複数の成分の測定をすることができ、また、1回の測定で複数の成分の測定をすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本実施形態に係る蛍光寿命測定装置の構成図である。

【図2】本実施形態に係る蛍光寿命測定装置の記憶部および演算部を説明する図である。

【図3】本実施形態に係る蛍光寿命測定装置の光検出器のアノード電極における蛍光光子検出の一例とヒットベクトルWおよび蛍光光子検出個数nとの関係を示す図である。

【図4】本実施形態に係る蛍光寿命測定方法を説明するために行ったシミュレーションで仮定した蛍光の波長分布を示す図である。

【図5】本実施形態に係る蛍光寿命測定方法を説明する

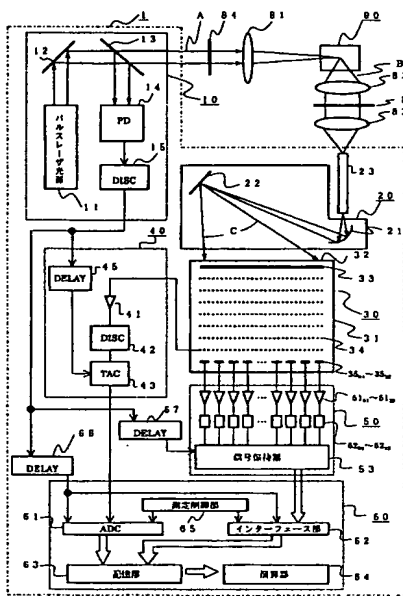
ために行なったシミュレーションに使用したパラメータと推定結果とを示す図表である。

【符号の説明】

1…蛍光寿命測定装置、10…励起光源部、11…パルスレーザ光源、12…反射鏡、13…ビームスプリッタ、14…フォトダイオード、15…波高弁別器、20…分光器、21…反射集光鏡、22…分散素子、23…光ファイバ、30…光検出器、31…真空容器、32…入射窓、33…光電変換面、34…ダイノード、35<sub>01</sub>…35<sub>32</sub>…アノード電極、40…蛍光光子検出時間測定

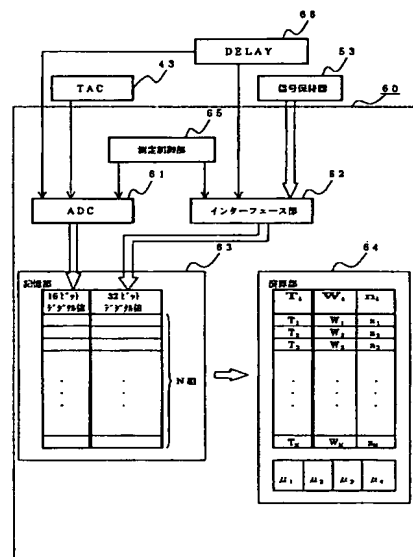
10

【図1】



部、41…増幅器、42…波高弁別器、43…時間振幅変換器、45…信号遅延器、50…蛍光光子数測定部、51<sub>01</sub>…51<sub>32</sub>…増幅器、52<sub>01</sub>…52<sub>32</sub>…波高弁別器、53…信号保持器、60…蛍光寿命推定部、61…AD変換器、62…インターフェース部、63…記憶部、64…演算部、65…測定制御部、66, 67…信号遅延器、81, 82, 83…レンズ、84, 85…バンドパスフィルタ、90…試料、A…パルス励起光、B…蛍光、C…分光された蛍光。

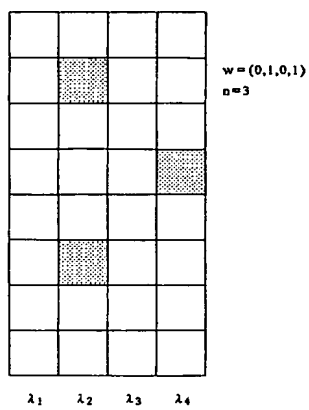
【図2】



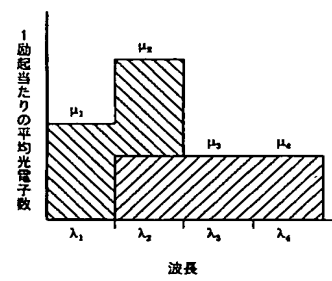
【図5】

|                        |                     | $\lambda_1$         | $\lambda_2$         | $\lambda_3$         | $\lambda_4$         |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| シミュレーションに<br>使用したパラメータ | 1/蛍光寿命              | $2.000 \times 10^3$ | $2.000 \times 10^3$ | $4.000 \times 10^3$ | $4.000 \times 10^3$ |
|                        | 1 励起光の平均光子数         | 0.160               | 0.160               | 0.100               | 0.100               |
| シミュレーションに<br>よる推定結果    | 1/蛍光寿命 ( $\tau_1$ ) | $2.038 \times 10^3$ | $2.601 \times 10^3$ | $4.077 \times 10^3$ | $4.078 \times 10^3$ |
|                        | 1 励起光の平均光子数         | 0.160               | 0.250               | 0.100               | 0.100               |

【図3】



【図4】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G043 AA03 CA01 CA03 EA01 FA03  
 GA04 GB01 GB21 HA01 HA05  
 JA01 JA03 JA04 KA08 KA09  
 LA02 LA03 NA01 NA04